

最新の GPCR 解析ツール：センサーからレポーターアッセイまで

創薬における重要な過程に、*in vitro* での活性評価があげられます。薬効薬理と異なり、多くの化合物を評価する必要性から、評価系は偽陽性・偽陰性が少なく、かつ簡便で定量性があることが求められます。プロメガは独自のバイオルミネッセンスを主軸の技術として、創薬に最適なアッセイ系を構築しています。今回は、G たんぱく質共役型受容体 (GPCR) を標的としたツールをご紹介します。GPCR は、作用薬アゴニストの結合を引き金として細胞にさまざまな変化をもたらします。これらの変化をライブセルで検出できるユニークなアッセイ系を紹介합니다。

cAMP センサーを内蔵したルシフェラーゼ **GloSensor™ cAMP** を細胞内に導入することにより、細胞内の cAMP 濃度のカインेटクスを観察することができます (図 1)。cAMP の測定は一般的に競合法で測定することが多く、通常 cAMP 増加に合わせてシグナルが低下しますが、本系はシグナルが増加する点と細胞数の至適化の必要が無い点が大きな特徴です。また、cAMP 増加にともなう **PKA の活性化**、すなわち PKA 触媒ドメイン (CA) から調節ドメイン (R2A) の解離をタンパク質間相互作用検出ツール NanoBiT® あるいは NanoBRET™ で測定することができます (図 2, 3)

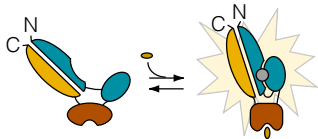


図 1. GloSensor™ cAMP の反応模式図

ルシフェラーゼに組み込まれた cAMP 結合ドメインに cAMP が結合することにより、構造が変化してルシフェラーゼ活性を獲得する。

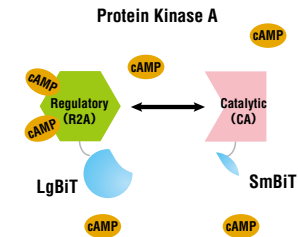


図 2. NanoBiT® による PKA 活性化の反応模式図

PKA 触媒ドメイン (CA)-SmBiT およびタイプ 2 調節ドメイン (R2A)-LgBiT は複合体を形成しており、細胞内 cAMP の増加に伴い R2A が解離し、NanoBiT® も 2 つに分かれて発光する。

(※ このアッセイ系は、NanoBiT® PPI Starter System のコントロールアッセイとして付属しています)。

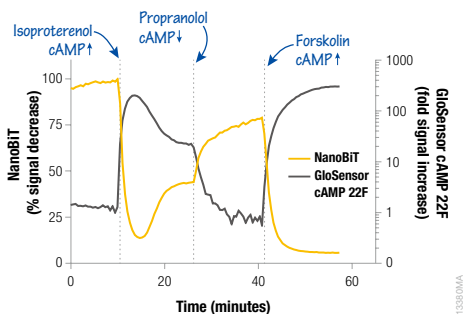


図 3. cAMP 濃度変化のダイナミクスをモニタリングできる 2 種類のバイオセンサー

β-2-アドレナリン作用性受容体発現細胞に、GloSensor™ cAMP あるいは NanoBiT® (Sm-BiT-CA および LgBiT-R2A) を発現させ、アゴニスト (インプロテレンール; ISO), アンタゴニスト (プロプラノール; PRO), アデニル酸シクラーゼ アクティベーター (フォスコリン; FSK) を順次添加した。NanoBiT® 反応の可逆性が観察されるとともに、GloSensor™ cAMP による細胞内 cAMP 濃度の変化と対称的なパターンを示した。

多くの GPCR のシグナル伝達は共役する G α サブユニットにより異なりますが、β-アレスチンの GPCR への結合は、G α サブユニットに依存しない系として知られています。プロメガでは、NanoBRET™ および NanoBiT® (図 4) を用いて、β-アレスチンの結合実験系を構築しました。

この系ではカインेटクスを取ることで、タイプ A 受容体とタイプ B 受容体では、異なった様式を示しました。

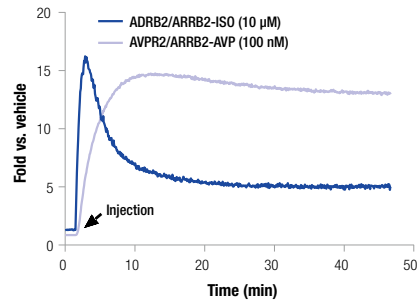


図 4. NanoBiT® による GPCR : β-アレスチンの相互作用モニタリング

β-2-アドレナリン作用性受容体 (ADRB2) およびアルギニンバソプレシン受容体 (AVPR2) に対する β-アレスチン 2 (ARRB2) の結合を NanoBiT® で観察した。ADRB2 アゴニストであるインプロテレンール (ISO) および AVPR2 アゴニスト Arg8-バソプレシン (AVP) でそれぞれを刺激前後の発光量を vehicle に対する比としてあらわした。(ACS Chem. Biol., 2015, DOI: 10.1021/acschembio.5b00753)

このほか、BRET を用いた GPCR の二量体化およびインターナリゼーション、細胞内 Ca 測定、エンドポイントでの cAMP の定量、応答配列によるレポーターアッセイなどがバイオルミネッセンスを用いて測定することができます (図 5)。特にレポーターアッセイでは、最新の NanoLuc® を用いたアッセイ系も可能になっています。

GPCR ではすべてセルベースアッセイをご紹介しましたが、セルフリーで行う多くの酵素アッセイ系もサポートしています。しかもすべて、混ぜるだけのホモジニアスアッセイです。

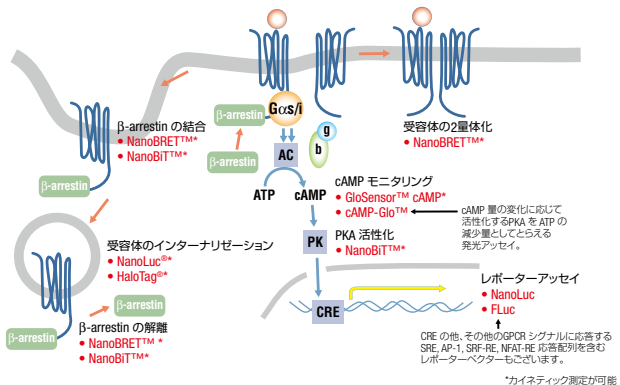


図 5. GPCR 研究を加速させる様々な発光アッセイツール

プロメガでは様々なセンサー、レポーターを用いたセルベースの GPCR 研究ツールを揃えています。

関連製品

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
センサー			
センサー発現ベクター			
pGloSensor™ -22F cAMP Plasmid	20 μg	E2301	114,000 (特)
pGloSensor™ -20F cAMP Plasmid	20 μg	E1171	114,000
検出試薬			
GloSensor™ cAMP Reagent	25 mg	E1290	57,000 (特)
	250 mg	E1291	260,000
タンパク質間相互作用			
NanoBiT® スターターキット			
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 キット	N2014	180,000
NanoBiT® PPI Flexi® System	1 キット	N2015	180,000 (特)

	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
NanoBRET™ スターターキット			
NanoBRET™ PPI MCS Starter System	1 キット	N1811	180,000 (特)
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System	1 キット	N1821	150,000 (特)
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	1,000 回分	N1662	200,000 (特)
レポーターベクター			
NanoLuc® シグナル応答ベクター			
pNL [NlucP/CRE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/SRE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/AP1-RE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/NFAT-RE/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)
pNL [NlucP/SRF/Hygro] Vector	20 μg	非カタログ品	78,000 (特)

◎ キャンペーン対象製品：詳細については 8 ページをご覧ください。